

15.11.2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

REC'D 13 JAN 2005

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 1 1 月 1 1 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 3 8 0 9 7 8
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 3 - 3 8 0 9 7 8]

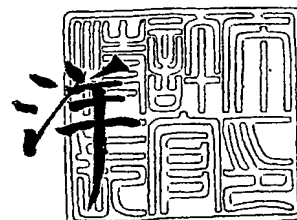
出 願 人 三井化学株式会社
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 2 月 2 2 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願
【整理番号】 P0002767
【提出日】 平成15年11月11日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12P 19/00
【発明者】
 【住所又は居所】 千葉県茂原市東郷 1 1 4 4 三井化学株式会社内
 【氏名】 三宅 仁基
【特許出願人】
 【識別番号】 000005887
 【氏名又は名称】 三井化学株式会社
 【代表者】 中西 宏幸
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 005278
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

ペントースとリン酸供与体とを酸性ホスファターゼの存在下に反応させるペントースー 5-リン酸エステル製造方法。

【請求項 2】

ペントースが 2-デオキシリボースであり、ペントースー 5-リン酸エステルが 2-デオキシリボースー 5-リン酸エステルである請求項 1 記載の製造方法。

【請求項 3】

リン酸供与体がポリリン酸又はその塩である請求項 1 または 2 のいずれか一項に記載の製造方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】ペントースー5ーリン酸エステルの製造方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、ペントースー5ーリン酸エステルの製造方法に関する。さらに詳しくは、医薬品及び機能化学品の製造原料の一つであるヌクレオシド類を合成する出発化合物として有用なペントースー5ーリン酸エステルの製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

ペントースー5ーリン酸エステルは、ヌクレオシド類を合成する出発化合物として有用な化合物である。例えば、2ーデオキシリボースー5ーリン酸エステルをホスホペンタムターゼにより2ーデオキシリボースー1ーリン酸エステルに変換し、次いでヌクレオシドホスホリラーゼによる各種核酸塩基とグリコシル化することにより、各種デオキシヌクレオシド類を製造する方法が報告されている（特許文献1）。

【0003】

この製造方法で用いられている2ーデオキシリボースー5ーリン酸エステルは、DNAの酵素による加水分解により調製されているが、この調整方法は、原料となるDNAが高価であり、分離・精製の工程の多い方法である。

【0004】

また、デオキシリボキナーゼを、2ーデオキシリボースならびにリン酸供与体であるアデノシントリリン酸（ATP）に作用させ、2ーデオキシリボースー5ーリン酸エステルを生成させる方法も報告されている（非特許文献1）。しかしながら、この方法に用いられるATPは高価である。

【0005】

ATPに比べて安価なポリリン酸をリン酸供与体とし、仔ウシ腸由来アルカリホスファターゼを用いて有機ヒドロキシル化合物をリン酸化する方法も報告されている（特許文献2）。ここには、有機ヒドロキシル化合物として、アルコール類であるグリセロール、糖類であるDーグルコース及びDーリボースを使用した実験が記載されている。Dーグルコース及びDーリボース等の糖類には分子内に複数個の水酸基が存在するが、該糖類の分子内に存在する水酸基のうちのどの水酸基にリン酸基が導入されるのかについては明らかにされていない。

【特許文献1】WO01/14566号公報

【特許文献2】特開平01-27484号公報

【非特許文献1】Arch. Biochem. Biophys., (1974), 164, 560

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、ペントースー5ーリン酸エステルを簡便に製造する方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、ピロリン酸と2ーデオキシリボースとの反応を酸性ホスファターゼの存在下で行うことにより、2ーデオキシリボースー5ーリン酸エステルのみが選択的に得られることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0008】

すなわち、本発明は、ペントースとリン酸供与体とを酸性ホスファターゼの存在下に反応させるペントースー5ーリン酸エステルの製造方法に関するものである。

【発明の効果】

【0009】

本発明によれば、2-デオキシリボース等のペントースと、ピロリン酸等のリン酸供与体とから、選択的に2-デオキシリボース-5-リン酸エステル等のペントース-5-リン酸エステルを製造することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

本発明に使用されるペントースとしては、例えば、2-デオキシリボース、リボース、キシロース、アラビノース、リキソースなどが挙げられる。これらはD体であってもL体であっても構わない。これらのなかでも、2-デオキシリボースは好ましい化合物である。

【0011】

前記ペントースは公知の製造方法によって得ることができ、また市販されているものを使用することもできる。

【0012】

本発明に使用されるリン酸供与体としては、酸性ホスファターゼの存在下で2-デオキシリボース等のペントースにリン酸基を与えて2-デオキシリボース-5-リン酸エステル等のペントース-5-リン酸エステルを生成させることができるものであれば制限はない。このようなリン酸供与体としては、例えば、ピロリン酸、トリポリリン酸、テトラポリリン酸、ポリリン酸、もしくはこれらのナトリウム塩又はカリウム塩等のアルカリ金属塩や有機リン酸エステルなどが挙げられる。これらのリン酸供与体は単独で使用してもよく、また二種類以上を併用することもできる。

【0013】

本発明に使用される酸性ホスファターゼとしては、2-デオキシリボース等のペントースの5位の炭素原子に結合する水酸基にリン酸基を導入する反応を触媒するものであれば特に制限はなく、例えば、種々の生物由来の酸性ホスファターゼが使用できる。好適な例として、アスペルギルス・フィカムなどのカビに由来するフィターゼ、サッカロミセス・セレビシエ、シュワニオミセス・オキシデンタリスなどの酵母に由来するフィターゼ、コムギなどの植物に由来するフィターゼ、サルモネラ・ティプムリアム、ザイモモナス・モビリス、モルガネラ・モルガニ、シゲラ・フレクスネリ、プレボテラ・インテルメディア、プロビデンシア・スチュアルティ、エンテロバクター・アエロゲネス、エシエリヒア・ブラッタエ、クレブシエラ・プランティコラなどの細菌に由来する酸性ホスファターゼ、ニワトリなどの動物に由来する酸性ホスファターゼ、ジャガイモなどの植物に由来する酸性ホスファターゼなどが挙げられる。これらは、市販品として入手することができる。

【0014】

本発明の製造方法には、酸性ホスファターゼ産生能を有する、微生物及び高等生物由来の細胞、酸性ホスファターゼをコードする遺伝子で形質転換された細胞そのもの及びこれら細胞の破砕物を使用することもできるが、該細胞、該細胞の破砕物及び該細胞の破砕物をカラムクロマトグラフィー処理して得られる酸性ホスファターゼ活性を含む画分を担体に担持させた固定化物を使用することもできる。

【0015】

本発明の製造方法の一実施態様としては、例えば、2-デオキシリボース等のペントース及びピロリン酸等のリン酸供与体を含む水溶液を所望のpHに調整し、次いで、酸性ホスファターゼを加えて反応させる方法が挙げられる。

【0016】

反応液中の2-デオキシリボース等のペントースの濃度は特に制限されないが、通常、100~700 g/Lの範囲で用いられる。

【0017】

反応液中のピロリン酸等のリン酸供与体の濃度は、酸性ホスファターゼの酵素活性が阻害されない範囲であれば特に制限はないが、通常、0.1~2 Mの範囲で用いられる。

【0018】

反応液中の酸性ホスファターゼの濃度は、特に制限されないが、通常、 $1 \sim 100 \text{ kU/L}$ の範囲で用いられる。

【0019】

反応温度は、2-デオキシリボース-5-リン酸エステル等のペントース-5-リン酸エステルが生成する温度範囲であれば特に制限はないが、 $20 \sim 40^\circ\text{C}$ の範囲から選択される。

【0020】

反応液のpHは、使用する酸性ホスファターゼの種類によって異なるため、一概に特定することはできないが、通常、pHは $4 \sim 6$ の範囲である。

【0021】

酸性ホスファターゼの中にはマグネシウムイオンなどの二価の金属イオンでホスファターゼ活性の向上が見られるものがあるため、必要に応じて、二価の金属塩のような多価金属化合物などを反応液中に存在させることができる。

【0022】

生成した2-デオキシリボース-5-リン酸エステル等のペントース-5-リン酸エステルは、反応液から金属塩として沈殿させる方法又はカラムクロマトグラフィー等の公知の分離方法を用いて分離することができる。

【0023】

以下、実施例により本発明の方法を詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。以下の実験で生成した2-デオキシリボース-5-リン酸エステルの分析は、高速液体クロマトグラフィーに依った。分析条件は次のとおりである。

【0024】

カラム: Shodex Asahipak NH2P-50 (昭和電工株式会社製)

移動相: 50 mM リン酸二水素ナトリウム溶液

検出: 示差屈折率計

【実施例1】**【0025】**

2-デオキシリボース 2.5 g 及びピロリン酸カリウム 0.33 g を含む水溶液を塩酸にて pH 4.5 に調整し、 5 ml に希釈した。これに 25 mg のアスペルギルス・フィカム由来フィターゼ (約 4 U/mg 、SIGMA 製) を加え、 37°C で1時間反応させた。反応液中の2-デオキシリボース-5-リン酸エステルをHPLCにて定量したところ、 31.7 mM の2-デオキシリボース-5-リン酸エステルの生成が確認された。

【産業上の利用可能性】**【0026】**

本発明は、2-デオキシリボース-5-リン酸エステル等のペントース-5-リン酸エステルを選択的かつ簡便に製造するのに有用である。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ペントースー5ーリン酸エステル of 簡便な製造方法を提供すること。

【解決手段】 ペントースとリン酸供与体とを酸性ホスファターゼの存在下に反応させるペントースー5ーリン酸エステル of 製造方法。

【選択図】 なし

特願 2003-380978

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000005887]

1. 変更年月日
[変更理由]
住 所
氏 名

2003年11月 4日
住所変更
東京都港区東新橋一丁目5番2号
三井化学株式会社